

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Sintomatologia Clínica, Alterações Bioquímicas e
Teciduais Observados Após Administração Oral de
Acetona Cianidrina no Modelo Murino**

Autor: Marcos Natal Rufino

Orientador: Heitor Miraglia Herrera

Co-Orientador: Marney Pascoli Cereda

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Saúde”

Campo Grande; Mato Grosso do Sul; Dezembro de 2014.

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Sintomatologia Clínica, Alterações Bioquímicas e
Teciduais Observados Após Administração Oral de
Acetona Cianidrina no Modelo Murino**

Autor: Marcos Natal Rufino

Orientador: Heitor Miraglia Herrera

Co-Orientador: Marney Pascoli Cereda

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Saúde”

Campo Grande; Mato Grosso do Sul; Dezembro de 2014.

Ficha catalográfica

Rufino, Marcos Natal

R926s Sintomatologia clínica, alterações bioquímicas e teciduais observados após administração oral de acetona cianidrina no modelo murino / Marcos Natal Rufino; orientação Heitor Miraglia Herrera. 2014
59 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2014.

1. Biotecnologia 2. Cianetos 3. Intoxicação I. Herrera, Heitor Miraglia
I. Título

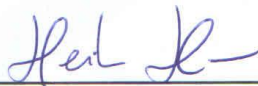
CDD – 660.6

**Sintomatologia Clínica, Alterações Bioquímicas e Teciduais,
Observadas após Administração Oral de Acetona Cianidrina no
Modelo Murino**

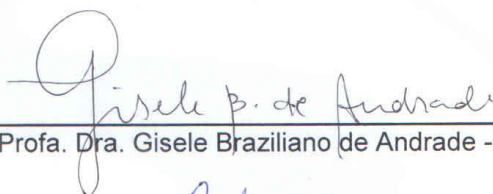
Autor: Marcos Natal Rufino
Orientador: Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera
Coorientadora: Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

APROVADO em 04 de dezembro de 2014.



Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera - UCDB
(orientador)



Profa. Dra. Gisele Brazilião de Andrade - UCDB



Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCDB

*“**DEUS** ME CONCEDA FALAR COM PROPRIEDADE E PENSAR DE FORMA CORRESPONDENTE AOS DONS QUE ME FORAM DADOS, PORQUE ELE É O GUIA DA SABEDORIA E O ORIENTADOR DOS SÁBIOS”.*

(Bíblia Sagrada, Livro da Sabedoria Capítulo 7; Versículo 15)

*A todas as pessoas que de forma direta ou indireta, contribuíram para
tornar este sonho possível.*

Em especial a minha família, pelo apoio, compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Heitor Herrera, pela dedicação,
competência, paciência e compreensão.

A Universidade Católica Dom Bosco, por disponibilizar a estrutura e
recursos necessários a realização deste experimento.

A minha Mãe Clarice, e ao meu Pai Domingos.

Aos meus filhos: Marcos, Lucas e Eduardo. E em especial a minha
Esposa Cristiane, pela dedicação, confiança e esforço. Sem Ela seria
impossível a realização deste sonho.

BIOGRAFIA

Marcos Natal Rufino, nascido em 20 de dezembro de 1968, na cidade de Presidente Prudente - SP. Filho de Domingos Rufino e Clarice Martins Rufino, Farmacêutico/Bioquímico formado na 9ª turma de Farmácia e Bioquímica da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em 1988. É especialista em Administração de Serviços de Saúde, formado em 2001 pela Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP. Atualmente é professor do Curso Técnico de Farmácia, ministrando aulas de Farmacologia Básica e também de Técnicas de Vendas e Administração de Farmácia Comercial no Colégio Criarte, Presidente Prudente, onde leciona desde 01/03/2002. É Responsável Técnico e proprietário da Drogaria Pró-Vida, desde 05/05/1995. É casado com Cristiane Aparecida Peruqui Rufino, tem três filhos: Marcos Peruqui Rufino, Lucas Peruqui Rufino e Eduardo Peruqui Rufino.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Utilização da Mandioca.....	3
2.2 A Criação de Ovinos no Brasil	4
2.3 Helmintoses dos Ovinos - Grave Problema Sanitário.....	4
2.4 Utilização da Mandioca como anti-helmíntico para ovinos	5
2.5 Utilização de compostos da mandioca para fins quimioterápicos.....	6
2.6 Metabolismo do Cianeto	7
2.7 Efeitos tóxicos de compostos da mandioca	8
3.OBJETIVO	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS:	14
4.1 Local	14
4.2 Teste de Toxicidade.....	14
4.3 Sintomatologia Clínica	15
4.4 Patologia.....	16
4.5 Exames Bioquímicos.....	16
4.6 Análise estatística	16
5. RESULTADOS.....	18
5.1 Mortalidade após a administração oral de acetona cianidrina	18
5.2 Sintomatologia	18

5.3 Dosagens Bioquímicas	19
5.4 Achados histopatológicos	20
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÕES	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doses de acetona cianidrina, em $\mu\text{mol/Kg}$, mg/kg de peso vivo administradas para cada grupo de ratos wistar, e os valores equivalentes a CN^-	15
Tabela 2. Porcentagem de animais que apresentaram sintomas e porcentagem de animais mortos em diferentes intervalos de tempo.....	19
Tabela 3. Valores médios com os respectivos desvios padrão dos resultados das dosagens de Creatinina, Uréia, Alanina Amino Transferase e Fosfatase Alcalina.....	20
Tabela 4. Alterações histopatológicas nos diferentes grupos de animais após a administração da acetona cianidrina.....	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema mostrando a cianogênese a partir de degradação enzimática da linamarina.....7
- Figura 2. Ilustração esquemática mostrando o mecanismo de ação do cianeto em nível de fosforilação oxidativa.....9
- Figura 3. Esquema ilustrando mecanismos de lesão celular.....10
- Figura 4. Esquema mostrando metabolismo do cianeto.....11
- Figura 5. Fotomicrografia de tecido pulmonar de ratos wistar. (a) Pulmão normal de um animal do grupo controle. Notar a espessura fina (setas) e textura delicada dos septos interalveolares (HE, obj. 4x). (b) Espessamento dos septos interalveolares devido ao aumento da celularidade (setas) e congestão leve (ponta de seta) de um animal do grupo cinco (HE, obj. 10x). (c) Reação inflamatória leve (setas) constituída por mononucleares em um animal do grupo cinco (HE, obj. 10x). (d) Reação inflamatória intensa de constituição mista (estrela) em um animal do grupo quatro. Observar o preenchimento dos espaços alveolares pelas células inflamatórias (HE, 10x). (e) Edema pulmonar em um animal do grupo cinco. Observar o preenchimento dos alvéolos por exsudato plasmático seroso (setas) (HE, obj. 20x). (f) Foco hemorrágico leve (seta) no interstício de um animal do grupo quatro (HE, obj. 10x).....23
- Figura 6. Fotomicrografia de tecido renal de ratos wistar. (a) Rim de um animal do grupo controle sem alterações morfológicas. Observar a ausência de conteúdo na luz dos túbulos e epitélio tubular (ponta de seta) e glomérulos (seta) preservados

(HE, obj.4x). (b) Acúmulo de cilindros hialinos no interior dos túbulos contornados proximais (setas) em um animal do grupo cinco (HE, obj. 4x). (c) Detalhe da figura anterior. Notar o material róseo intratubular (HE, obj. 40x). (d) Área de congestão moderada (setas) em um animal do grupo três (HE, obj. 4x). (e) Epitélio tubular em degeneração (setas) e alguns túbulos com o epitélio íntegro (ponta de seta) em um animal do grupo controle (HE, obj. 10x). (f) Degeneração do epitélio tubular em um animal do grupo dois. Observar o citoplasma vacuolizado e deslocamento lateral de alguns núcleos (setas) (HE, obj. 40x)..... 24

Figura 7. Fotomicrografia de tecido hepático de ratos wistar. (a) Fígado de um animal do grupo controle sem alterações morfológicas. Observar a preservação dos hepatócitos (HE, obj. 40x). (b) Vacuolização do citoplasma dos hepatócitos (setas) e alguns núcleos em picnose (ponta de seta) de um animal do grupo cinco (HE, 40x). (c) Reação inflamatória leve de constituição mista (setas) em um animal do grupo três (HE, 10x). (d) Espaço porta de um animal do grupo dois com vaso linfático, ducto biliar (ponta de seta) e artéria (seta) normais (HE, 40x). (e) Alterações no espaço porta em um animal do grupo cinco. Observar o acúmulo de tecido fibroso (setas) e células inflamatórias circundando a tríade portal (HE, 10x). (f) Alterações no espaço porta com fibrose intensa ao redor do ducto biliar (seta) e intensa congestão (ponta de seta) em um animal do grupo cinco. Observar a destruição maciça dos hepatócitos (estrelas) que deveriam estar circundando essa região (HE, obj. 40x).....25

Figura 8. Fotomicrografia de tecido do sistema nervoso central de ratos wistar. (a) Cérebro de um animal do grupo controle sem alterações morfológicas (HE, 4x). (b) Cerebelo de um animal do grupo dois sem alterações morfológicas. Observar a arquitetura preservada da camada molecular (estrelas) (HE, obj. 10x). (c) Espongiose da neurópila (estrela) em um animal do grupo cinco (HE, obj. 10x). (d) Detalhe da figura anterior. Observar os numerosos vacúolos de diferentes tamanhos (setas) (HE, obj. 40x). (e) Degeneração neuronal (seta) em um animal do grupo cinco (HE, obj. 40x). (f) Congestão em um animal do grupo cinco (setas) (HE, obj. 10x).....26

Resumo

A mandioca por apresentar elevados teores energéticos e protéicos tem sido amplamente utilizada na alimentação humana e também de ruminantes. Ainda, possui propriedades anti-neoplásicas e anti-helmínticas. Entretanto, efeitos tóxicos vêm sendo registrados em ruminantes e em animais de experimentação. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos tóxicos da acetona cianidrina, metabólito da linamarina, presente na mandioca, em ratos wistar. Utilizou-se para este estudo seis grupos com cinco animais cada, os quais receberam 25, 50, 75, 100 e 125 μmol de acetona cianidrina em uma única dose oral. O grupo controle recebeu água acidificada pH 3,5. Os animais foram observados durante a administração da acetona cianidrina, e durante as 48 horas subsequentes. A sintomatologia clínica apresentada pelos animais foi observada e registrada. Também foram dosadas enzimas séricas para avaliação das funções renal e hepática. Por ocasião da necropsia, foram colhidas amostras de tecidos para exames histopatológicos. Logo após a administração da acetona cianidrina, alguns animais dos grupos G2 (50 μmol), G4 (100 μmol) e G5 (125 μmol) apresentaram sintomatologia nervosa expressa por convulsão, contração muscular involuntária, andar cambaleante, incapacidade de coordenação motora, prostração e midríase. Todos os animais do G5 e quatro animais do G4 morreram em até sete minutos da

administração da acetona cianidrina. Alguns animais, especialmente do G2, se recuperaram da fase aguda permanecendo vivos até o final do experimento. As análises bioquímicas revelaram que houve comprometimento hepático. A histopatologia revelou lesões severas no encéfalo (edema e degeneração) e fígado (degeneração hidrópica e necrose), além de edema pulmonar. Conclui-se com o presente trabalho que no modelo murino a acetona cianidrina, embora apresente efeitos tóxicos hepáticos, pulmonares e no sistema nervoso central, em concentrações de até 25 $\mu\text{mol/kg}$ de peso vivo, os animais sobrevivem à fase aguda.

Palavras Chave: neurotóxico, hepatotóxico, cianeto, intoxicação aguda, hipóxia tissular.

Abstract

The cassava have been widely used in food and also ruminants feed due it has high energetic and protein contents. Moreover also shows anti-neoplasm and anti-helminthics properties. Otherwise, toxic effects have been reported in ruminants and in experimentation animals. This study aims to verify, in the Wistar rats, the toxic effects of the acetone cyanohydrin, a linamarin metabolite present in cassava. For this study, six groups with five animals each one, were used which received 25, 50, 75, 100 and 125 μmol in a single dose of acetone cyanohydrin. The control received acidified water pH 3,5. The animals were observed during the acetone cyanohydrin administration and during the subsequent 48 hs. The clinical symptomatology presented by animals was evaluated. Serum enzymes were also measured in order to evaluate renal and hepatic functions. At the necropsy tissue samples were taken for histopathological examination. Immediately after acetone cyanohydrin administration, some animals from groups G2 (50 μmol), G4 (100 μmol) and G5 (125 μmol) presented neurological symptomatology such as convulsion, involuntary muscular contraction, staggering gait, motor coordination disability, prostration and mydriasis. All the animals of G5 and four animals of G4 died after seven minutes after acetone cyanohydrin administration. Some animals, especially of the G2, recovered from the acute phase, kept alive until the end of the trial. Biochemical analyzes revealed that there was hepatic destruction.

Histopathology showed severe encephalo lesions (edema and degeneration) and in the liver (hydropic degeneration and necrosis), as well pulmonary edema. It could be concluded with this study that, in the murine model, the animals survive from the acute phase, although the acetone cyanohydrin caused hepatics, pulmonary and central nervous system toxic effects in concentrations until 25 $\mu\text{mol/Kg}$ bodyweight.

Keywords: neurotoxic, hepatotoxic, cyanid, acute intoxication, tissue hypoxia.

1 Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta*) é o produto mais popular da alimentação brasileira desde o início da colonização. Produto polivalente e que apresenta usos diversificados. Além do papel que desempenha na alimentação popular e na culinária nacional, é também utilizada na composição dos mais diversos produtos industriais, constituindo matéria-prima da indústria: Alimentícia, têxtil, farmacêutica, química e de rações para animais.

A mandioca faz parte de um grupo de plantas chamadas cianogênicas. Ela possui, tanto na parte aérea quanto nas raízes, substâncias como a linamarina e o lotaustralin que, em condições de pH neutro ou próximo da neutralidade ou de destruição tecidual da planta, são capazes de liberar ácido cianídrico, ou cianeto. Esse processo envolve uma reação enzimática que converte a linamarina em acetona cianidrina, por ação da linamarase, enzima encontrada em todos os tecidos da mandioca. Os seres humanos e muitos animais têm a capacidade de promover a desintoxicação causada por cianeto, pois, como a exposição ao cianeto é inevitável, muitos organismos desenvolveram vias que lhes permitem fazer a desintoxicação deste composto. No entanto, quando a quantidade de cianeto é superior à capacidade que mecanismos de desintoxicação naturais são capazes de eliminar, existe a possibilidade de envenenamento por cianeto.

Tanto a linamarina como a acetona cianidrina vem sendo utilizadas, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, no controle da proliferação de células neoplásicas e no

combate a helmintos gastro-entéricos de ruminates. O grande desafio na utilização desses compostos cianogênicos está em se conhecer a dosagem correta para evitar a intoxicação. A literatura apresenta doses letais para linamarina e mesmo para cianeto livre, mas não são encontradas informações para a acetona cianidrina, para a qual a liberação de cianeto não depende de ação enzimática, mas apenas de temperatura e pH. Dois projetos vem sendo realizados na Universidade Católica Dom Bosco, envolvendo vários alunos de iniciação científica, um deles objetiva investigar a ação da acetona cianidrina em células tumorais de cães e o outro a ação da acetona cianidrina no combate a helmintos (*Haemonchus contortus*) de ovinos, daí a importância em aprofundar os conhecimentos acerca dos efeitos tóxicos e dosagens seguras.

2 Revisão de literatura

2.1 Utilização da Mandioca

A mandioca é uma cultura antiga, rústica, com baixo custo de implantação e pouco exigente quanto às condições de fertilidade do solo. Sua produção ocorre durante o ano todo, mesmo em condições de baixo investimento tecnológico (Ohara & Cereda, 2006). Seu bom desenvolvimento em solos pobres, bem como a resistência a períodos de seca, tornaram a mandioca um alimento básico para milhões de pessoas em países em desenvolvimento da América Latina e África. Em vários países, como China e Índia, ela é matéria prima para as indústrias de amido, álcool e acetona (Lopes, 2001). Embora a cultura da mandioca proporcione bons lucros à agricultura empresarial, sempre foi tratada como cultura de subsistência devido às qualidades facilitadoras para que o pequeno produtor rural a produza. Desta maneira pode se tornar fonte de renda e opção para a sua própria alimentação, ou como fonte de suplementação da alimentação de animais de produção, em especial os ovinos. De acordo com Silva & Dias (2004) a mandioca é considerada uma planta forrageira completa, com elevados teores energéticos na raiz e protéicos na parte aérea, além de conter razoáveis quantidades de minerais e vitaminas (Ohara & Cereda, 2006).

A mandioca é uma planta cujo cultivo tem-se atribuído um papel social importante, com mais de 80% da produção concentrada em estabelecimentos que utilizam a mão-de-obra familiar. No Mato Grosso do Sul, 65,0% da mandioca é produzida nas áreas menores que 100 ha, dos quais, 44,8% em áreas menores que 10 ha. O consumo semanal de mandioca de mesa nesse estado é de cerca de 1,8 kg por família, sendo 124,2% superior à média de consumo nacional (Otsubo e Pezarico, 2002). Ainda, a parte aérea da mandioca (ramas e folhas) é um alimento volumoso que apresenta bom valor nutritivo para os ruminantes, podendo ser introduzida na dieta dos animais representando uma forma de utilização de resíduos dessa cultura, principalmente aos pequenos produtores rurais.

2.2 A Criação de Ovinos no Brasil

O Brasil possui um rebanho de aproximadamente 16,7 milhões de ovinos; com as maiores concentrações no Nordeste (10.110.352 cabeças), Sul (4.946.495 cabeças) e Centro-Oeste (1.209.581 cabeças). O Mato Grosso do Sul possui o maior rebanho da região Centro-Oeste, com 497.631 cabeças, tendo apresentado um aumento de 1,6% do rebanho, em relação a 2010 (IBGE 2011). A produção de ovinos destaca-se por oferecer oportunidades de mercado para os agricultores familiares, pois necessitam de áreas menores que o gado para sua manutenção (Teixeira e Silva, 2007). Ainda, devemos considerar que a sobrevivência da agricultura familiar necessita de modernização e adoção de tecnologias eficientes, que, se por um lado pode apresentar pequenos investimentos (Teixeira e Silva, 2007), por outro os animais estão sujeitos à parasitose, o que exige grande atenção por parte do produtor (Cezar *et al.* 2008).

2.3 Helmintoses dos Ovinos - Grave Problema Sanitário

Na ovinocultura, a verminose gastrintestinal é o principal problema sanitário. A verminose aparece como um problema crônico que leva a perdas na produtividade tanto de lã como de carne, envolvendo custos com tratamentos e, em casos extremos, mortalidade de animais, especialmente jovens e fêmeas ovinas no peri-parto. Em alguns casos mais graves e agudos levam o animal a morte (Jardim, 1974; Hammerberg, 1986).

O frequente surgimento de surtos de verminoses na criação de pequenos ruminantes em diferentes regiões brasileiras é o reflexo do modelo inadequado de controle utilizado pelos produtores como erros no momento e na administração, a persistência da utilização de compostos anti-helmínticos com o mesmo princípio químico e a falta de medidas adequadas de manejo. Todos esses fatores, causados por deficiência de informações técnicas adequadas que estejam disponíveis aos pecuaristas, contribuem para um rápido desenvolvimento da resistência anti-helmíntica (Cezar *et al.* 2008).

A resistência parasitária aos medicamentos é uma característica quantitativa, ela é definida pelos dados numéricos de sensibilidade às drogas ou dose de ensaios de resposta com diferentes cepas do parasita muitas vezes tendo diferentes níveis de resistência (Coles *et al.* 2006; Demeler, *et al.* 2010). Também, a comunidade técnico-científica vem alertando quanto aos resíduos de alguns compostos químicos eficazes no combate aos helmintos, porém com efeitos residuais em produtos alimentícios e no meio ambiente (Corwin, 1997; Shaw *et al.* 1997; Thamsborg *et al.* 1999; Vercrusse & Dorny, 1999).

Dentre os helmintos, o *Haemonchus contortus* destaca-se como o de maior importância econômica na criação de ovinos, mundialmente. É extremamente patogênico e com grande capacidade de resistir e adaptar-se as condições climáticas mais diversas (Lindquist *et al.* 2001) e possui grande capacidade de desenvolver resistência a drogas anti-helmínticas convencionais, é a espécie de helminto que desenvolveu resistência mais rapidamente e a espécie na qual a resistência é mais difundida (Kaplan, 2004).

2.4 Utilização da Mandioca como anti-helmíntico para ovinos

As propriedades anti-helmínticas da mandioca foram observadas por Seng & Preston (2003) inicialmente com o uso da folhagem de mandioca na alimentação de ovinos. Com esta prática, também foi relatada a redução na contagem de ovos nas fezes (OPG), tanto em caprinos (Seng & Preston, 2003), como em gado leiteiro e búfalos (Netpana *et al.* 2001; Granum *et al.* 2007).

Uma hipótese a se considerar para explicar o efeito antiparasitário da mandioca seria a presença destes glicosídeos cianogênicos em todas as partes da planta (Silva *et al.* 2011). Resultados de estudos *in vitro* com extratos de forragem de mandioca mostraram eficácia nematicida na concentração de 0,3 mg/Kg quando na larva de terceiro estágio do *H. contortus*, mas esse efeito não foi constatado como ovicida sobre esse nematóide (López *et al.* 2004).

Apenas uma avaliação *in vitro* dos compostos secundários isoladamente, em condições controladas, poderia estabelecer quais destes compostos têm ação contra helmintos gastrointestinais. Nesse sentido, resultados prévios, ainda não publicados, obtidos do projeto de número 4107 PIBITI/UCDB (ciclo 2012/2013), determinaram que compostos como a acetona cianidrina tem propriedade antiparasitária contra o nematoide *H. contortus*, resistente às drogas sintéticas comerciais. Neste trabalho se estabeleceu a dose letal de 50% (DL50) e dose letal de 98% (DL98) deste composto, relacionando ao peso médio de 100 larvas infectantes de *H. contortus*.

2.5 Utilização de compostos da mandioca para fins quimioterápicos

No Brasil, estima-se o surgimento de neoplasias em mais de 500 mil casos novos por ano. Somente no estado do Mato Grosso do Sul, as estimativas apontam para a ocorrência de mais de 8.000 casos novos de câncer em 2015 (Ramalho, 2014).

No conceito mais atual em que compostos são usados em quimioterapia devido à ação mais seletiva e menos agressiva, o cianeto derivado da linamarina tem sido testado com sucesso. Seu metabólito a acetona cianidrina, através de seu equivalente molar de cianeto, foi capaz de promover no tumor ascítico de Ehrlich uma diminuição no número total de células tumorais, preservando as células não-tumorais. Ainda, impediu o desenvolvimento tumoral em 20% dos animais tratados (Ramalho, 2010). Oxtoby e Hughes (1991) estudaram a estrutura e interações entre linamarina e linamarase, Keresztessy *et al.* (2001) utilizaram a linamarina em testes de terapia gênica, demonstrando o potencial para o tratamento do câncer. Kousparou *et al.* (2002) descreveram um processo baseado

na enzima β -glicosidase em combinação com uma “pro-droga” (linamarina) com produção de cianeto citotóxico.

A toxicidade do cianeto se deve a sua inibição da cadeia respiratória em nível celular, e afeta todas as células do organismo. A destoxificação também ocorre em nível celular. Neste ponto as células normais se mostraram mais eficientes que as células neoplásicas. Isto se deve à presença da enzima rodanase, que ocorre em maior quantidade nas células normais do que nas células neoplásicas. Assim as células neoplásicas se tornam alvos do efeito tóxico do cianeto (Ramalho, 2010).

2.6 Metabolismo do Cianeto

Convenciona-se que a atividade da linamarase delimita o início da cianogênese (Ramalho, *et al.* 2007). A linamarase, que hidrolisa linamarina a acetona cianidrina (quimicamente conhecida como hydroxisobutironitrile) e glicose, é bem estudada e caracterizada em diferentes tecidos da mandioca (Ramalho, *et al.* 2007). A hydroxisobutironitrile se decompõe espontaneamente ou enzimaticamente a cianeto e acetona através da ação da HN-liase, enzima purificada e caracterizada nas folhas de mandioca de cultivares sul americanos (Lopes, 2001) (Figura 1).

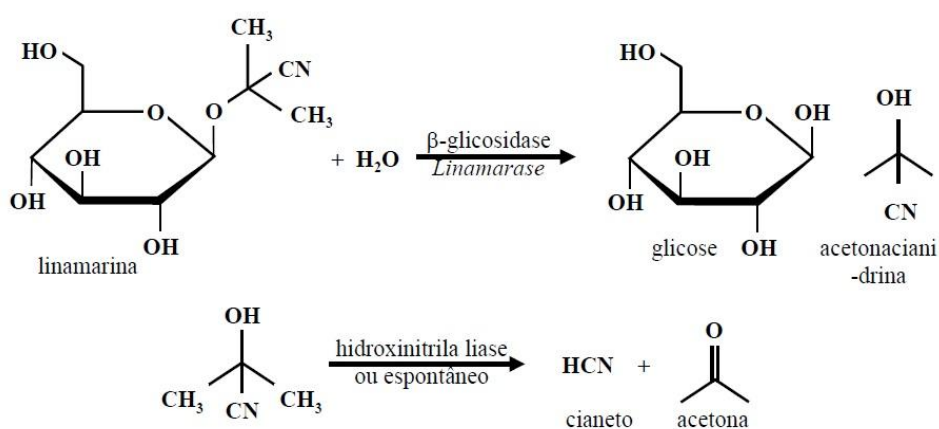


Figura 1: Esquema mostrando a cianogênese a partir degradação enzimática da linamarina (Lopes, 2001)

A acetona cianidrina é um líquido aquoso, incolor, com odor suave de amêndoas e miscível em água. É utilizado comercialmente na fabricação de acrílico (metil poli metacrilato). Acetona cianidrina tem a massa molecular de 85.11, densidade 0,925 a 25 ° C e ponto de fusão de -19 ° C é capaz de liberação espontânea de cianeto sempre que o pH for neutro ou alcalino (Llorens 2004; Ramalho *et al.* 2010; Soler-Martín *et al.* 2010).

O cianeto é uma substância comum no ambiente, e tanto os homens como os animais podem ser expostos a ela por diferentes meios, os quais incluem água, plásticos, acrílicos, fumaça de cigarro e plantas cianogênicas. A linamarina e lotaustralina são fontes de cianeto conhecidos por estarem presentes na mandioca (Ramalho *et al.* 2007).

Os cianetos são majoritariamente absorvidos pela mucosa gastrointestinal e respiratória, embora também possam ser absorvidos pela pele e mucosa ocular se houver um contacto prolongado, sendo estes casos mais raros (Alves *et al.* 2013). Quando os sais de cianetos são ingeridos, o baixo pH do estômago faz liberar HCN. O HCN é uma molécula com baixo peso molecular e boa solubilidade em lipídeos e em água e por essa razão é rapidamente absorvido, independentemente da via de exposição. No caso da exposição oral, a absorção pode ocorrer em poucos minutos. A ingestão leva a elevados níveis de cianeto no fígado relativamente maiores que a inalação, mas ambas conduzem a elevados níveis de cianeto no coração, pulmões e cérebro (Gupta, 2009).

Após a absorção, o cianeto distribui-se através do sangue por aproximadamente 40% da superfície corporal total. No sangue, o cianeto, está na sua maior parte ligado a proteínas plasmáticas (60%), mas também é transportado ligado a glóbulos vermelhos ou sob a forma de cianeto livre (100x em menor quantidade que o cianeto transportado nos glóbulos vermelhos) (Alves *et al.* 2013).

2.7 Efeitos tóxicos de compostos da mandioca

O cianeto difunde-se passivamente do sangue para os tecidos através das membranas celulares devido à diferença de concentração. Uma vez no interior das células, o cianeto compromete a fosforilação oxidativa, um processo

mitocondrial que utiliza oxigênio para produção de energia na célula na forma de ATP (Beasley & Glass, 1998) por inibir a ação da enzima citocromo-oxidase a3, impedindo assim a transferência de elétrons do NADH (nicotinamida adenina nucleotídeo) ao oxigênio. Ao nível de hemácias, a inibição do ciclo do ácido tricarboxílico causado pela inibição da citocromo-oxidase, resulta numa elevada afinidade de ligação do cianeto com o íon férrico encontrado na porção heme da forma oxidada desta enzima, tornando a hemoglobina incapaz de transportar oxigênio (Hammel, 2011) (Figura 2). O resultado final é a inibição da utilização do oxigênio pelos tecidos, hipóxia tissular, e rápida deterioração das funções vitais (Beasley & Glass; 1998).

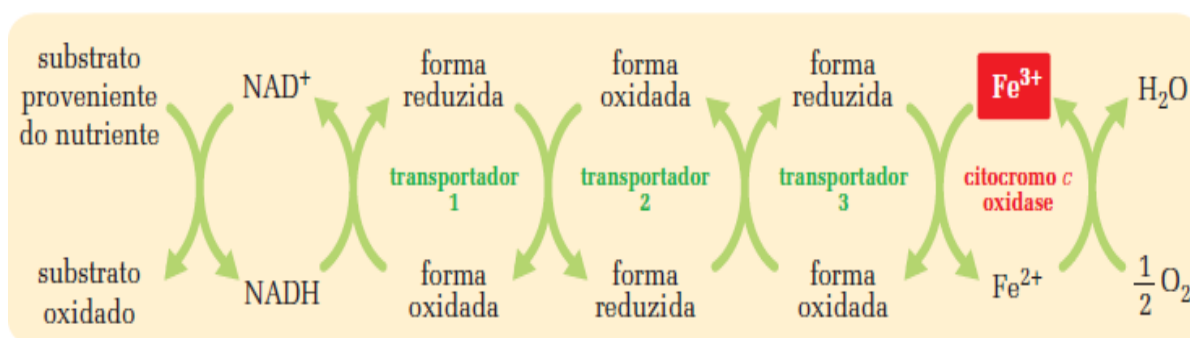


Figura 2: Ilustração esquemática mostrando o mecanismo de ação do cianeto em nível de fosforilação oxidativa.

Alternativamente, as células utilizam a via anaeróbica produzindo elevados níveis de lactato, resultando em acidose metabólica (Alves *et al.* 2013), levando a alterações na membrana celular e desencadeando lesões reversíveis, que afetam apenas o citoplasma e irreversíveis quando o núcleo é afetado (figura 3). Assim, o cianeto diminui significativamente o ATP das células e aumenta grandemente os níveis séricos de lactato (Beasley & Glass, 1998).

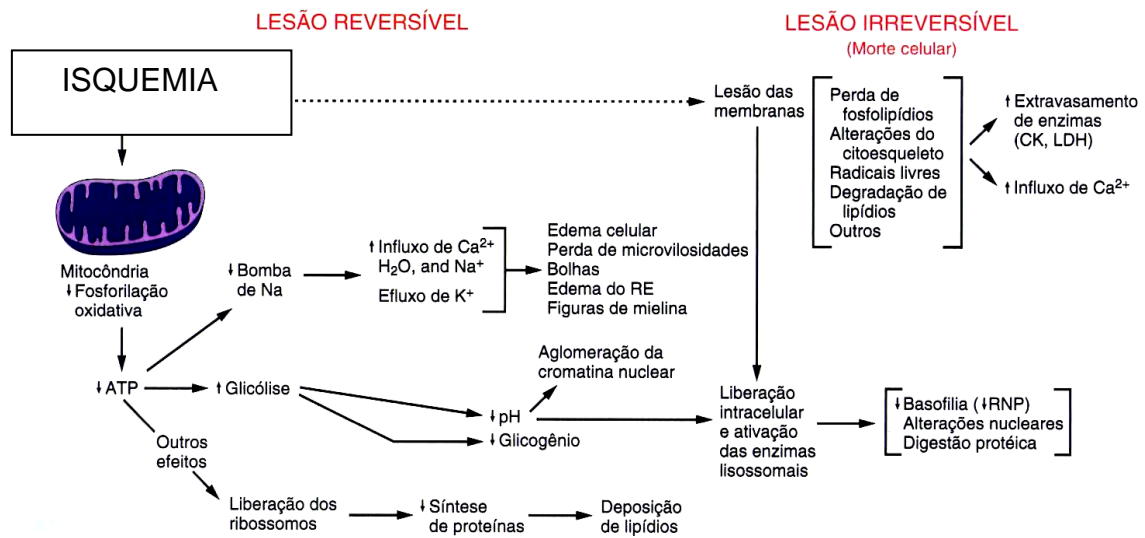


Figura 3: Esquema ilustrando mecanismos de lesão celular (Robbins & Cotran, 2010)

O complexo de citocromo-oxidase a3 não é a única enzima afetada. Outros mecanismos metabólicos são considerados significativos, particularmente no envenenamento grave pelo cianeto. Assim, já se sabe que pode ocorrer vasoconstrição arteriolar pulmonar e/ou da artéria coronária, diminuindo o débito cardíaco e, em casos extremos, resultando em choque. No entanto, os mecanismos precisos por trás das alterações circulatórias não foram totalmente elucidados (Beasley; Glass, 98).

Ainda, o cianeto é considerado uma neurotoxina específica, responsável por promover uma inversão das concentrações de Ca^{++} intra e extracelular, que deve ser 0,1 μmol e 1,3 μmol , respectivamente. Concentrações elevadas de cianeto intracelular promovem liberação do glutamato mitocondrial armazenado, mobilização de reservas de cálcio intracelulares, e ativação dos canais de cálcio voltagem dependentes (receptores N-metil-D-aspartato, NMDA) (Robbins & Cotran, 2010). Pensa-se que o aumento do cálcio intracelular ativa a protease que converte a xantina desidrogenase em xantina oxidase, que na presença de oxigênio catalisa a formação de radicais livres resultando na peroxidação lipídica (Robbins & Cotran, 2010). A peroxidação lipídica acaba por provocar disfunção mitocondrial por alterar uma pequena proteína associada a sua membrana

(citocromo C). Se as células forem as do sistema nervoso central pode resultar em morte neuronal e neuro-degeneração (Couto, 2010).

Também, o aumento excessivo de Ca^{++} intracelular provoca um esgotamento de neurotransmissores na fenda sináptica neuro-muscular, resultando em aumento na atividade elétrica, o que pode ser um importante fator para os efeitos neurotóxicos, tais como tremores e convulsões causadas pelo cianeto (Manzano, 2006).

A metabolização do cianeto ocorre em todas as células humanas normais, principalmente nas células hepáticas. A desintoxicação ocorre através da combinação de cianeto com enxofre (S) para formar tiocianato através de reações catalisadas pela rodanase (Hammel, 2011). O tiocianato formado é menos tóxico, e é eliminado através da urina (Alves *et al.* 2013).

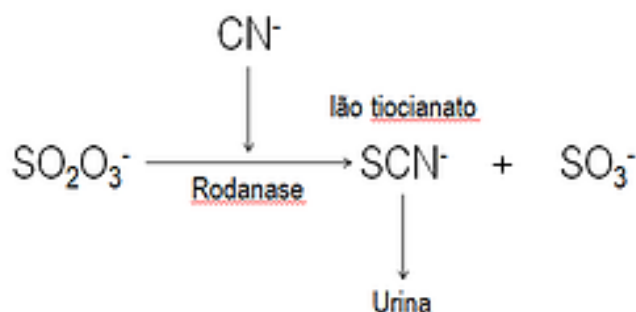


Figura 4: Esquema mostrando metabolismo do cianeto (Alves *et al.* 2013).

Estudos toxicológicos em ratos com linamarina administrada oralmente em dose de $324,86 \pm 1,5$ mg/Kg/peso corporal, não resultaram em anóxia de células do sistema nervoso central (Ramalho *et al.* 2007). Também, não foram detectadas alterações significativas nas dosagens bioquímicas.

Outros autores comprovaram que a acetona cianidrina quando aplicada por via subcutânea em ratos apresenta efeitos agudos, incluindo hiporreflexia, prostração ou postura reclinada com hipotonia muscular, depressão ou movimentos

superficiais de ventilação acelerada, e convulsões tônico-clônicas dos membros. Estes efeitos começaram dentro de um a dois minutos de administração, e duraram 30 a 60 minutos. Efeitos semelhantes foram observados com doses orais de 235 $\mu\text{mol} / \text{Kg}$ ($n=2$), enquanto que em um rato que foi administrado uma dose maior (88 $\mu\text{mol} / \text{Kg}$), morreu através de convulsões (Soler-Martín *et al.* 2010).

Outros experimentos utilizaram *Manihot glaziovii* como alimento para caprinos após diferentes tempos e formas de processamento. Eles mostraram efeitos tóxicos agudos, com importantes sintomas neurológicos atribuídos a glicosídeos cianogênicos presentes na planta (Amorim *et al.* 2005).

3 Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos citotóxicos em diferentes concentrações de acetona cianidrina administradas oralmente em ratos wistar.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar manifestações clínicas e alterações nas concentrações séricas da ALT, FA, creatinina e uréia em ratos wistar, após única administração oral de diferentes dosagens de acetona cianidrina;

3.2.2 Avaliar lesões teciduais através do exame histopatológico dos órgãos: pulmão, rins, fígado, coração e no sistema nervoso central de ratos wistar, após uma única administração oral de diferentes dosagens de acetona cianidrina.

4 Materiais e métodos

4.1 Local

Os testes de toxicidade foram realizados no setor de patologia do hospital veterinário da UCDB – Universidade Católica Dom Bosco, em Campo Grande – MS. Foram utilizados ratos wistar recém desmamados com peso variando entre 80 e 160g. Os animais foram obtidos no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco - UCDB. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno retangulares grandes (49 x 34 x 16 mm), forradas com cama de maravalha, em sala climatizada sob temperatura constante, com ciclo de 12h claro / 12h escuro, com ventilação apropriada e alimentados com água natural e ração (oferecidas “*ad libitum*”). Todos os procedimentos de manipulação seguiram os princípios éticos internacionais de uso de animais para experimento. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, sob o protocolo nº 006/2013.

4.2 Teste de Toxicidade

Foi utilizada a acetona cianidrina sintetizada no laboratório Bio Saúde da UCDB, seguindo o roteiro descrito por Cox & Stormont (1935). Para avaliar o grau de pureza, o cianeto livre da acetona cianidrina sintetizada foi comparado com o cianeto livre de cianeto de potássio (KCN Marca VETEC com 96% de pureza) utilizado com padrão. O método foi o descrito por Brito *et al* (2009). A leitura da cor foi feita em espectro colorímetro Bel , usando a curva de calibração $Y = 0.6635 \cdot X -$

0.0215, com $r^2 = 0.996$, onde Y é o teor de CN^- e X a leitura de absorvância em na faixa de 535 nm. O calculo de cianeto livre comprovou o produto de síntese com 99% de pureza.

Utilizou-se seis grupos com cinco animais cada (Tabela 1). As concentrações de acetona cianidrina foram calculadas em função do peso dos animais de cada grupo, a partir de estudos prévios (Soler-Martín *et al.* 2010). As diferentes diluições de acetona cianidrina, foram feitas utilizando-se água acidificada pH 3,0 a 3,5, esta providencia torna a acetona cianidrina estável, evitando a liberação do CN^- por volatilização quando ela entra em contato com o meio ambiente (Llorens 2004; Soler-Martín *et al.* 2010). O experimento teve duração de 48 horas a partir da administração de uma dose única por via oral de acetona cianidrina (Tabela 1).

Tabela 1: Doses de acetona cianidrina, em $\mu\text{mol/Kg}$, mg/kg de peso vivo administradas para cada grupo de ratos wistar, e os valores equivalentes a CN^-

Grupo	Peso	Dose	Dose	CN^-
Controle (-)	≥ 80 e $100 \text{ gr} \leq$	Água acidificada (pH 3,0 a 3,5)		
Grupo 1	≥ 180 e $205 \text{ gr} \leq$	$25 \mu\text{mol/Kg}$	2,13 mg/kg	0,65mg/kg
Grupo 2	≥ 130 e $160 \text{ gr} \leq$	$50 \mu\text{mol/Kg}$	4,25 mg/kg	1,30mg/kg
Grupo 3	≥ 130 e $160 \text{ gr} \leq$	$75 \mu\text{mol/Kg}$	6,38 mg/kg	1,95mg/kg
Grupo 4	≥ 80 e $100 \text{ gr} \leq$	$100 \mu\text{mol/Kg}$	8,50 mg/kg	2,6mg/kg
Grupo 5	≥ 80 e $100 \text{ gr} \leq$	$125 \mu\text{mol/Kg}$	10,63 mg/kg	3,25mg/kg

Cada mol de acetona cianidrina equivale a 85g de acetona cianidrina, ou ainda, um mol de acetona cianidrina contem 26g de CN^- (Brito *et al.* 2009).

4.3 Sintomatologia Clínica

Os animais foram observados durante a administração da acetona cianidrina, e monitorados durante as 48 horas que duraram os experimentos. A sintomatologia apresentada pelos animais foi observada e registrada.

4.4 Patologia

Os animais que vieram a óbito durante este período foram necropsiados imediatamente. Por ocasião da necropsia, foram coletados fragmentos de coração, fígado, rim e cérebro. Todo material coletado foi fixado em formol a 10%, para posterior preparação das laminas histológicas. Os ratos que sobreviveram após o período de 48 horas pós-administração oral e os ratos do grupo controle foram eutanasiados, em concordância com a licença do CEUA/UCDB (sedação profunda com ketamina e câmara de CO₂), do Laboratório de Farmacologia e Mutagênese da UCDB e passaram pelo mesmo processo de necropsia citado anteriormente. Para cada um dos grupos tratados, sempre que determinada lesão foi observada em pelo menos três dos cinco animais, foi considerado efeito tóxico da concentração utilizada e assim registrada como tal.

4.5 Exames Bioquímicos:

Imediatamente após a morte dos animais foram coletadas amostras de sangue obtidas por punção cardíaca. Após coagulação do sangue foi separado o soro, este foi encaminhado para análises. Foram dosadas as concentrações séricas da ALT, e da FA, para avaliação da função hepática. Foram dosadas também a uréia e a creatinina sérica para avaliação da função renal. As dosagens foram feitas pelo “Laboratório Veterinário Diagnóstico”. Foram utilizados kits comerciais Gold Analisa Diagnóstico Ltda e o método de análise foi o cinético-colorimétrico (Mendes & Lopes, 1973)

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas consideraram apenas as dosagens bioquímicas dos animais que sobreviveram à administração oral da acetona cianidrina, visto que, segundo Vasconcelos 2007, estima-se que seja necessário um intervalo mínimo de seis horas entre a ocorrência do fator desencadeante da lesão tecidual e a elevação da concentração sérica das enzimas hepáticas, bem como dos marcadores da função renal. Os níveis máximos devem ocorrer em um período aproximado de 48 horas, declinando após 72 horas (Vasconcelos, 2007).

Os resultados obtidos nas dosagens bioquímicas foram analisados estatisticamente pelos testes de Mann-Whitney ou pelo Teste t-student não

pareado para comparar as dosagens entre: GCxG1, GCxG2, GCxG3, GCxG4 e GCxG5 das variáveis: creatinina, uréia, ALT e FA. E pelo teste de Kruskal-wallis para comparar as dosagens entre GCxG1xG2xG3xG4xG5 das variáveis creatinina, uréia, ALT e FA. A análise estatística foi realizada por meio do pacote estatístico InStat versão 3.0 [DATASET.1SD] (1998), considerando um mínimo de significância de 5%.

5 Resultados

5.1 Mortalidade após a administração oral de acetona cianidrina

Após a administração da acetona cianidrina, quatro animais do G5 (125 μmol), e todos os cinco animais do G4 (100 μmol), morreram em um período que variou entre zero e sete minutos (Tabela 2). Um dos animais do G2 (50 μmol) morreu imediatamente após a administração da acetona cianidrina. Deste modo, utilizaram-se nas análises estatísticas as dosagens bioquímicas apenas dos animais dos grupos G1, G2, G3 e GC.

5.2 Sintomatologia

Um dos animais do G2 (50 μmol) apresentou convulsão e contração muscular involuntária, estes sintomas apareceram imediatamente após a administração da acetona cianidrina e cessaram após 10 minutos. Os demais não apresentaram qualquer sintomatologia.

Os cinco animais do G4 (100 μmol) que morreram entre um e sete minutos após a administração oral da acetona cianidrina apresentaram os seguintes sintomas: andar cambaleante, incapacidade de coordenação motora, prostração e midríase.

No G5 (125 μmol), apenas um animal apresentou sintomatologia expressa por convulsão e contração muscular involuntária antes que a morte ocorresse após sete minutos. O animal do G5 que sobreviveu até o final do experimento, apresentou logo após a administração da acetona cianidrina, contração muscular

involuntária, prostração, convulsão e tetania, sintomas que desapareceram após 40 minutos.

Os animais dos GC, G1 e G3 não apresentaram sintomas aparentes e também não ocorreram mortes até o período das 48 horas que duraram os testes. O número de animais que apresentaram sintomas observados após a administração de acetona cianidrina, bem como o número de animais que morreram encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de animais que apresentaram sintomas e porcentagem de animais mortos em diferentes intervalos de tempo

Grupos	Sintomas (%)		Mortalidade (%)	
	Tempo (minutos)			
	> 0 e 30 ≤	> 31 e 60 ≤	> 0 e 1 ≤	> 2 e 10 ≤
Controle (-)	0	0	0	0
1 (25 µmol)	0	0	0	0
2 (50 µmol)	40	20	0	20
3 (75 µmol)	0	0	0	0
4 (100 µmol)	100	0	0	100
5 (125 µmol)	80	20	60	20

5.3 Dosagens Bioquímicas

A tabela 3 mostra as médias das dosagens obtidas de creatinina, uréia, ALT e FA e os respectivos desvios padrão.

Tabela 3: Valores médios com os respectivos desvios padrão dos resultados das dosagens de Creatinina, Uréia, Alanina Amino Transferase e Fosfatase Alcalina.

Grupo	Creatinina	Ureia	ALT	FA
	-----mg dL ⁻¹ -----		-----U L ⁻¹ -----	
Controle (-)	0,6±0,1 ^a	37,8±3,6 ^a	121,4±29,0 ^a	100,1±18,7 ^a
1 (25 µmol)	0,6±0,1 ^a	35,8±3,9 ^a	143,9±22,0 ^a	137,4±28,6 ^b
2 (50 µmol)	0,5±0,1 ^a	45,1±8,8 ^a	152,0±46,3 ^a	171,2±70,8 ^b
3 (75 µmol)	0,5±0,1 ^a	37,9±6,8 ^a	161,9±32,3 ^a	158,1±28,2 ^b

Letras diferentes nas linhas representam diferença estatística significativa entre os grupos. ALT: Alanina Amino Transferase. FA: Fosfatase Alcalina.

As dosagens de FA demonstraram aumento na atividade desta enzima, sendo a diferença estatisticamente significativa nos grupos: G1 (25 µmol), G2 (50 µmol) e G3 (75 µmol) em comparação com o GC após as 48 horas do experimento. Nos demais grupos, as análises estatísticas não foram feitas, já que houve morte de todos animais do G4 e de quatro animais do G5 impossibilitando as análises estatísticas. Já as dosagens de creatinina, uréia e ALT não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos G1 (25 µmol), G2 (50 µmol) e G3 (75 µmol) em comparação com o GC após as 48 horas do experimento, também não foram realizadas análises estatísticas para o G4 e G5 devido ao alto índice de mortalidade.

5.4 Achados histopatológicos

Nas análises histopatológicas foi possível observar (ver figuras paginas: 23, 24, 25 e 26) tanto aspectos normais com preservação da arquitetura bem como alterações morfológicas de intensidade variável nas amostras teciduais de pulmão (Fig. 5), rim (Fig. 6), fígado (Fig. 7), sistema nervoso central (Fig. 8) e coração. Embora algumas alterações tenham sido observadas tanto nos animais dos grupos controle e tratados (Tabela 4), a intensidade com que elas se apresentavam no grupo controle era mais leve do que nos demais.

Tabela 4: Alterações histopatológicas nos diferentes grupos de animais após a administração da acetona cianidrina.

Grupos	PULMÃO					RIM		
	Espessamento Septo Alveolar	Congestão	Edema	Inflamação	Hemorragia	Congestão	Proteína Intra-tubular	Degeneração Hidrópica
G1 25 µmol	x	X				x	x	
G2 50 µmol	x			x			x	
G3 75 µmol	x	X	x			x	x	
G4 100 µmol	x	X	x	x	x	x	x	
G5 125 µmol	x	X	x	x		x	x	x
GC água acidificada	x	X				x	x	x

Grupos	FÍGADO					CÉREBRO			CORAÇÃO
	Degeneração Hidrópica	Congestão	Necrose	Inflamação	Alterações Espaço porta	Congestão	Edema	Degeneração	Congestão
G1 25 µmol	x								
G2 50 µmol		x				x			
G3 75 µmol		x	x	x			x	x	x
G4 100 µmol	x	x				x			
G5 125 µmol	x	x	x	x	x	x	x	x	x
GC água acidificada		x				x			x

X: Alteração observada em mais de 50% dos animais do grupo

Ao exame histopatológico do GC, observou-se no pulmão, espessamento de septos alveolares e congestão (fig. 5b). No rim havia proteína intratubular, em pouca quantidade, congestão e degeneração hidrópica. No fígado e coração e cérebro dos animais desse grupo havia apenas congestão.

No G1 (25µmol) foi verificado no pulmão, espessamento de septos alveolares e congestão (fig. 5b). O rim apresentava-se congesto e com proteína intratubular. No fígado observou-se apenas degeneração hidrópica dos hepatócitos. No cérebro e coração não foram observadas alterações.

No pulmão do G2 (50 µmol) foi observado espessamento de septos alveolares. No rim dos animais, havia degeneração hidrópica e proteína intratubular. No fígado e cérebro foi observado apenas congestão, não ocorrendo qualquer alteração no tecido cardíaco.

Os animais do G3 (75 µmol) apresentaram espessamento de septos alveolares, congestão e edema no pulmão. No rim, congestão e proteína intratubular. Necrose, congestão e presença de células inflamatórias mononucleares foram observadas no fígado. No cérebro observou-se edema e degeneração. No coração havia apenas congestão.

A histopatologia dos animais do G4 (100 μ mol) mostrou espessamento de septo alveolar, congestão, edema, hemorragia e presença de reação inflamatória mista no pulmão. No rim, congestão e presença de proteína intratubular. No fígado observou-se congestão e degeneração hidrópica. No cérebro havia apenas congestão e no coração não foi observado nenhuma alteração.

Os animais do G5 (125 μ mol) apresentaram ao exame microscópico alterações mais severas do que nos demais grupos. Observou-se no pulmão espessamento dos septos alveolares, congestão, edema e reação inflamatória. No rim, havia congestão e presença de proteína intratubular. No fígado havia congestão, áreas de necrose de coagulação, degeneração hidrópica dos hepatócitos, reação inflamatória de constituição mista e alterações no espaço porta. No cérebro foi observado, degeneração neuronal (cromatólise), congestão, edema e desmielinização do cerebelo, observada pela presença de vacúolos grandes na substância branca.

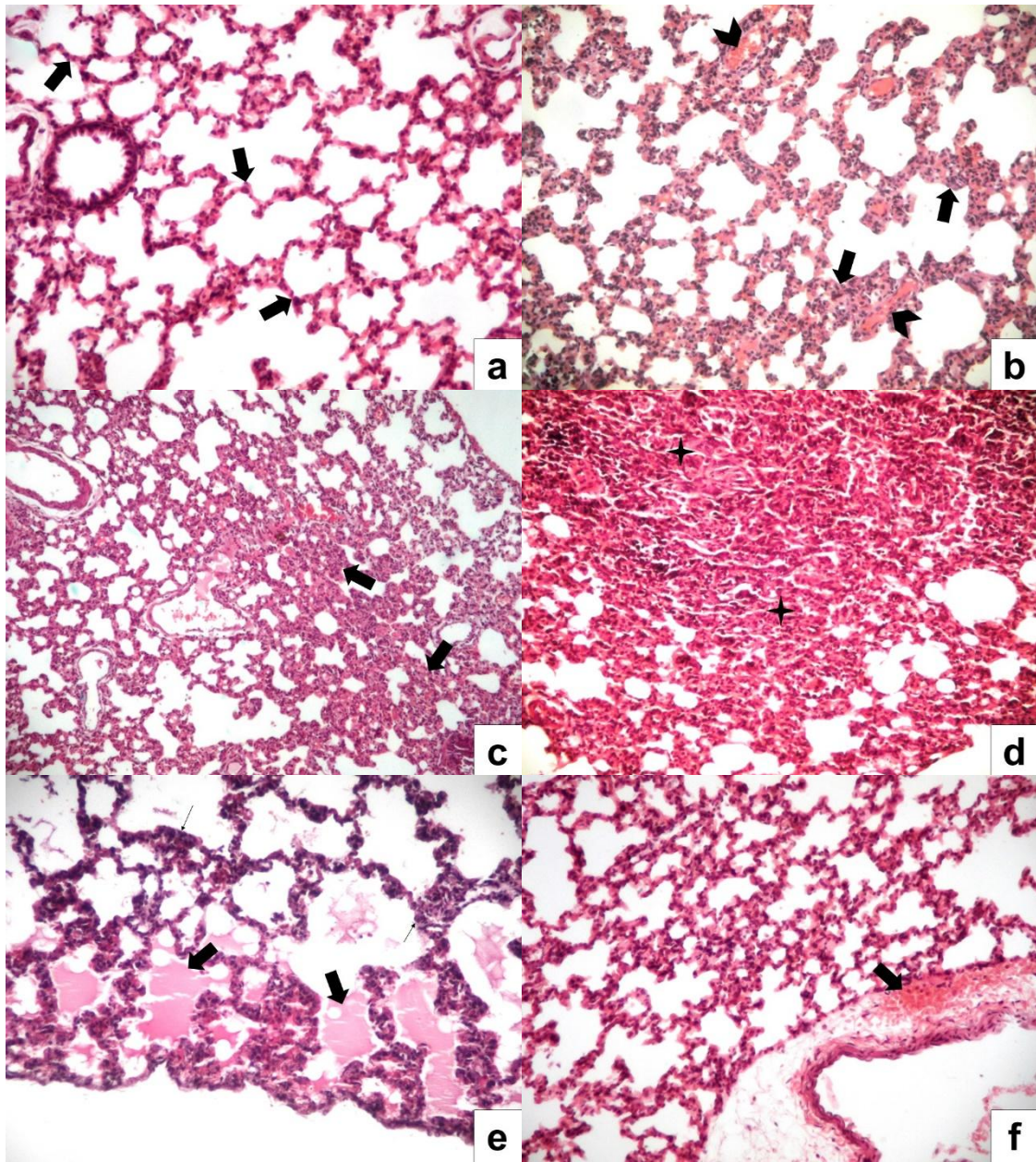


Figura 5: Fotomicrografia de tecido pulmonar de ratos wistar. (a) Pulmão normal de um animal do grupo controle. Notar a espessura fina (setas) e textura delicada dos septos interalveolares (HE, obj. 4x). (b) Espessamento dos septos interalveolares devido ao aumento da celularidade (setas) e congestão leve (ponta de seta) de um animal do grupo cinco (HE, obj. 10x). (c) Reação inflamatória leve (setas) constituída por mononucleares em um animal do grupo cinco (HE, obj. 10x). (d) Reação inflamatória intensa de constituição mista (estrela) em um animal do grupo quatro. Observar o preenchimento dos espaços alveolares pelas células inflamatórias (HE, 10x). (e) Edema pulmonar em um animal do grupo cinco. Observar o preenchimento dos alvéolos por exsudado plasmático seroso (setas) (HE, obj. 20x). (f) Foco hemorrágico leve (seta) no interstício de um animal do grupo quatro (HE, obj. 10x).

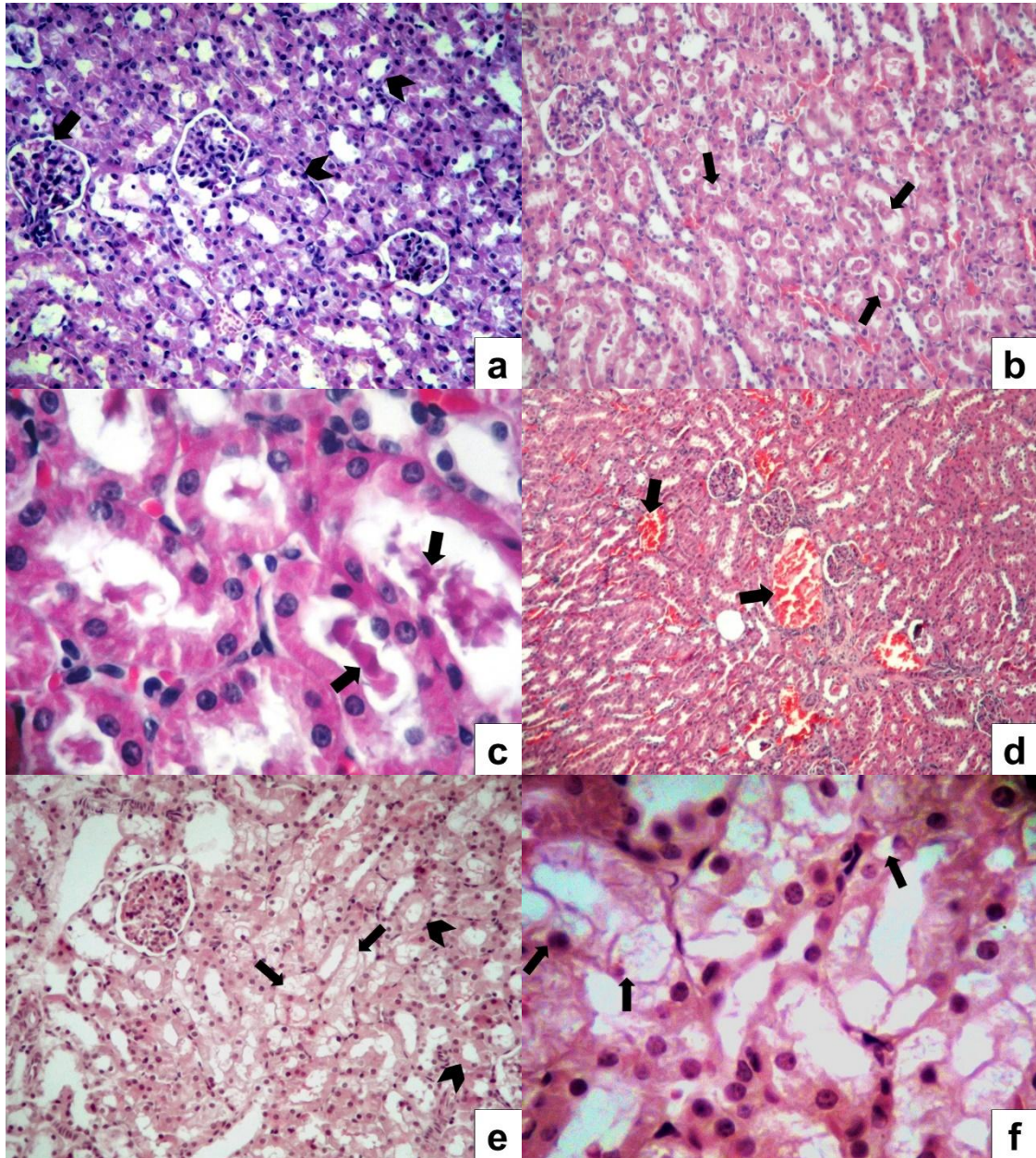


Figura 6: Fotomicrografia de tecido renal de ratos wistar. (a) Rim de um animal do grupo controle sem alterações morfológicas. Observar a ausência de conteúdo na luz dos túbulos e epitélio tubular (ponta de seta) e glomérulos (seta) preservados (HE, obj.4x). (b) Acúmulo de cilindros hialinos no interior dos túbulos contornados proximais (setas) em um animal do grupo cinco (HE, obj. 4x). (c) Detalhe da figura anterior. Notar o material róseo intratubular (HE, obj. 40x). (d) Área de congestão moderada (setas) em um animal do grupo três (HE, obj. 4x). (e) Epitélio tubular em degeneração (setas) e alguns túbulos com o epitélio íntegro (ponta de seta) em um animal do grupo controle (HE, obj. 10x). (f) Degeneração do epitélio tubular em um animal do grupo dois. Observar o citoplasma vacuolizado e deslocamento lateral de alguns núcleos (setas) (HE, obj. 40x).

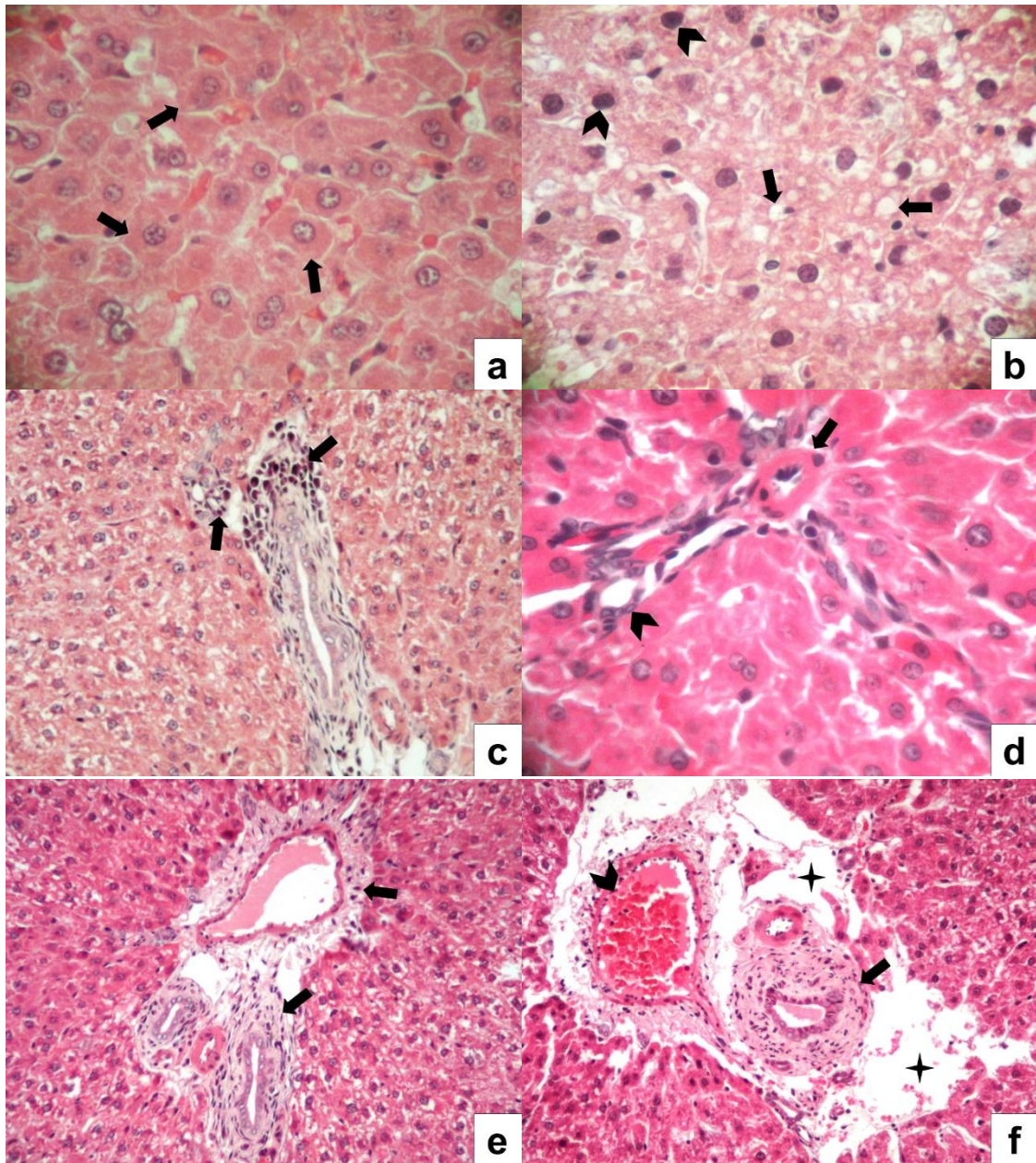


Figura 7: Fotomicrografia de tecido hepático de ratos wistar. (a) Fígado de um animal do grupo controle sem alterações morfológicas. Observar a preservação dos hepatócitos (HE, obj. 40x). (b) Vacuolização do citoplasma dos hepatócitos (setas) e alguns núcleos em picnose (ponta de seta) de um animal do grupo cinco (HE, 40x). (c) Reação inflamatória leve de constituição mista (setas) em um animal do grupo três (HE, 10x). (d) Espaço porta de um animal do grupo dois com vaso linfático, ducto biliar (ponta de seta) e artéria (seta) normais (HE, 40x). (e) Alterações no espaço porta em um animal do grupo cinco. Observar o acúmulo de tecido fibroso (setas) e células inflamatórias circundando a tríade portal (HE, 10x). (f) Alterações no espaço porta com fibrose intensa ao redor do ducto biliar (seta) e intensa congestão (ponta de seta) em um animal do grupo cinco. Observar a destruição maciça dos hepatócitos (estrelas) que deveriam estar circundando essa região (HE, obj. 40x).

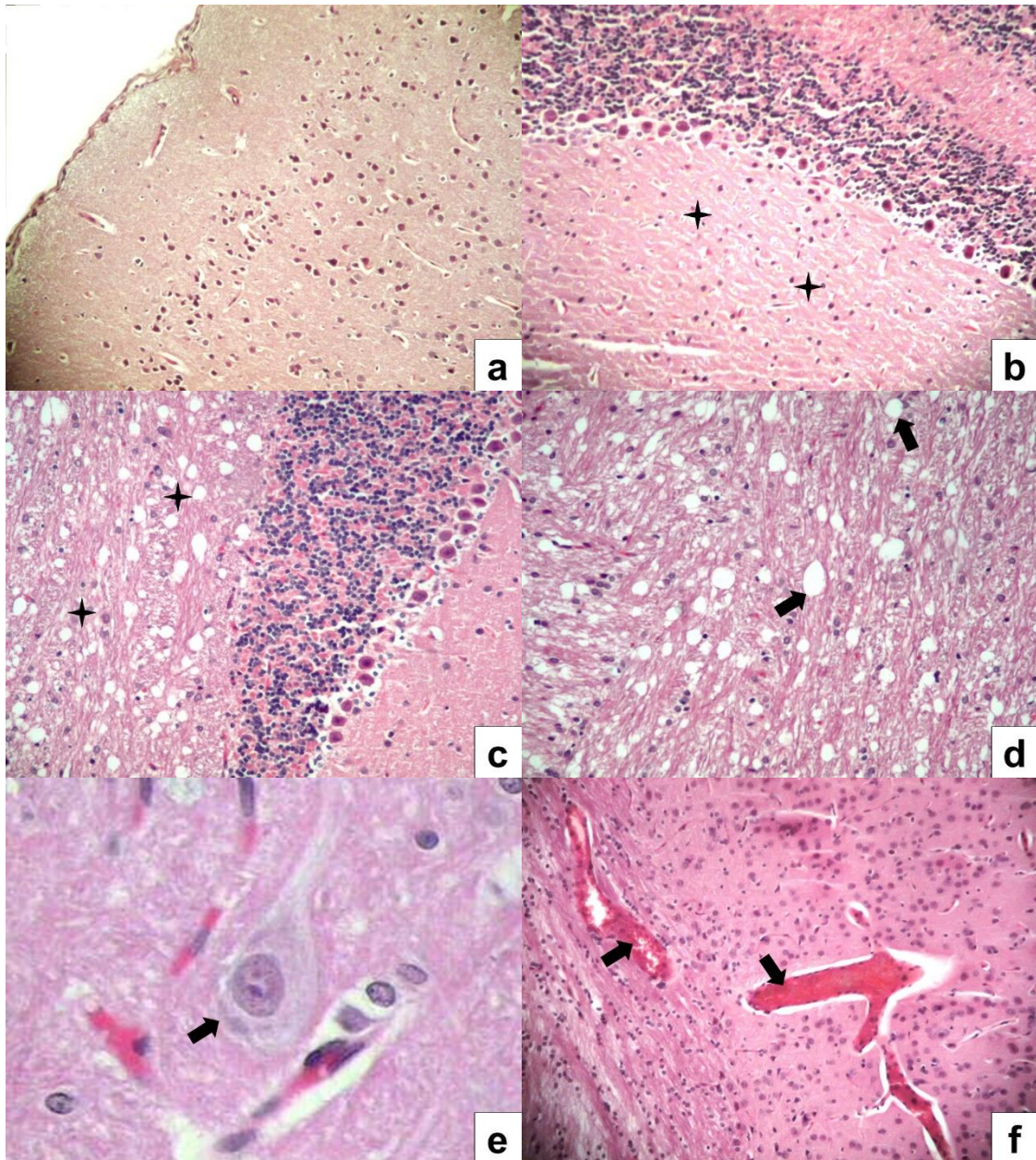


Figura 8: Fotomicrografia de tecido do sistema nervoso central de ratos wistar. (a) Cérebro de um animal do grupo controle sem alterações morfológicas (HE, 4x). (b) Cerebelo de um animal do grupo dois sem alterações morfológicas. Observar a arquitetura preservada da camada molecular (estrelas) (HE, obj. 10x). (c) Espongiose da neurópila (estrela) em um animal do grupo cinco (HE, obj. 10x). (d) Detalhe da figura anterior. Observar os numerosos vacúolos de diferentes tamanhos (setas) (HE, obj. 40x). (e) Degeneração neuronal (seta) em um animal do grupo cinco (HE, obj. 40x). (f) Congestão em um animal do grupo cinco (setas) (HE, obj. 10x).

6 DISCUSSÃO

A intensidade das lesões e dos sintomas provocados pela intoxicação do cianeto é dose-dependente, quanto maior a concentração, mais rapidamente é a morte celular (Gupta, 2009). Isso explica o fato dos animais que receberam doses elevadas de acetona cianidrina (G5 125 μmol e G4 100 μmol) morrerem poucos minutos após a administração.

As mortes observadas neste estudo precederam de sintomatologia nervosa como incordenação, andar cambaleante, prostração e midríase. De fato, os sintomas de intoxicação se iniciam poucos minutos após a ingestão de acetona cianidrina, e o cianeto, provável agente tóxico final em grandes concentrações, afeta o sistema nervoso central, inicialmente estimulando-o e depois deprimindo-o (Gupta, 2009). A sintomatologia nervosa observada no presente trabalho foi também observada no trabalho de Soler-Martin (2010) em ratos inoculados parenteralmente com acetona cianidrina. Em trabalho com intoxicação por cianeto, Alves (2013) também descreve sintomas coincidentes aos observados neste estudo que incluem períodos de inconsciência, em casos severos evoluindo para coma, convulsões, edema pulmonar e morte. Além dos sintomas em comum, Alves (2013) também observou hiperpnéia, em casos mais graves dispnéia, bradicardia e colapso cardiovascular. Hariharakrishnan *et al.* (2010) citam que o efeito do cianeto é mais evidenciado na atividade motora, quando na intoxicação aguda. Também Gupta (2009), relata que baixas concentrações de cianeto podem produzir sintomas como taquicardia, dispnéia e agitação, enquanto que concentrações mais elevadas provocam incordenação de movimentos, convulsão,

dispnéia, disfunção cardíaca e respiratória. Amorim (2005) relatou também sintomatologia nervosa da intoxicação experimental por *Manihot glaziovii* em caprinos.

Um dos sintomas mais evidentes apresentados pelos animais deste estudo foi à convulsão, ela se caracteriza por perda de consciência e alterações no tônus muscular, podendo levar a perda do controle dos esfíncteres. É causada por uma descarga energética descontrolada e geralmente temporária de origem cerebral (Miller, 2001). Este sintoma também foi descrito por Ribeiro (2012) em aplicação intraperitoneal de acetona cianidrina em diferentes concentrações em camundongos.

A convulsão, juntamente com os sintomas de tetania e contrações musculares involuntárias observadas nos animais, provavelmente são causados pela perda da homeostasia associada ao desequilíbrio das concentrações de cálcio intra e extracelular, que como consequência final leva as células a um estado de excitação constante (Guyton & Hall 2010). Couto (2010) associa intoxicações por cianeto à elevação de cálcio intracelular. Esta elevação seria causada pela liberação do cálcio armazenado no interior do retículo endoplasmático e a incapacidade de carreamento deste cálcio através das bombas de cálcio para o meio extracelular, já que este mecanismo é dependente de gasto de ATP, cuja produção, nas intoxicações pelo cianeto, esta comprometida. Como consequência acontece uma inversão das concentrações de cálcio intra e extra-celular, que se acumula no interior da célula e diminui no exterior.

Sabe-se ainda que doses agudas de cianeto diminui significativamente o ácido gama aminobutírico (GABA) e eleva o glutamato em diferentes regiões cerebrais (Hariharakrishnan *et al.* 2010). Gaba é o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central dos mamíferos, desempenha um papel importante na regulação da excitabilidade neuronal ao longo de todo o sistema nervoso. Nos seres humanos, o GABA também é diretamente responsável pela regulação do tônus muscular (Guyton & Hall 2010). O glutamato, armazenado em vesículas nas sinapses, é o mais comum neurotransmissor excitatório em mamíferos. Assim, o quadro de tetania e hiper-exitação observados no presente

estudo podem estar associados à diminuição do GABA e a elevação do glutamato, provenientes de um desequilíbrio do Ca^{++} intra e extracelular. De fato, é reportado que o principal órgão afetado por cianeto é o sistema nervoso central (Way, 1984). Em humanos, a intoxicação por cianeto pode resultar na neurodegeneração seletiva e progressiva no SNC, similar a neuropatologia associada à doença de Parkinson (Mills *et al.* 1999).

A não observação de aumento sérico da creatinina e da uréia nos diferentes grupos estudados está em consonância com a ausência de alterações teciduais renais significativas. Entretanto, a taxa de uréia pode estar reduzida na insuficiência hepática aguda (Oliveira Lima *et al.* 1985), o que foi observado em vários indivíduos nos grupos tratados. Ainda, poderíamos esperar alguma lesão renal causada pelo cianeto nos animais estudados, porém, devido à provável atividade da rodanase, que também está presente nos rins, as lesões observadas foram de pouca intensidade. Este fato nos leva a deduzir que ali também a inativação do cianeto a tiocianato ocorreu de maneira eficiente, em consequência, não houve a formação de radicais livres em quantidades que promoveriam a superoxidação das membranas celulares renais (Aletor, 1993). Assim, como não observamos elevação nos níveis séricos de uréia e creatinina, e constatamos danos teciduais renais de intensidade leve, podemos inferir que a superoxidação das membranas celulares renais em consequência da atividade do cianeto não afetou de forma significativa as funções renais, já que a síndrome urêmica sistêmica ocorre somente quando há comprometimento de mais de 50% da função renal (Souza, 2004). Os valores obtidos neste estudo para uréia e creatinina foram semelhantes aos obtidos por Sousa (2004), cujo estudo não demonstrou diferença significativa dos níveis séricos de uréia e creatinina de ratos tratados cronicamente com cianeto, mas diferem dos resultados de Manzano (2006) que estudou os níveis de uréia e creatinina em porcos após exposição crônica a cianeto e encontrou diferenças significativas nos níveis séricos destas substâncias no plasma dos animais estudados.

Não observamos elevação significativa nas dosagens séricas de ALT por que sua elevação é descrita em hepatites com evolução crônica, e processos cirróticos etílicos e biliares, nas hepatites ativas, nos cânceres secundários ou

primários do fígado e na colestase (Kamoun, 1989). Entretanto, os valores obtidos para a atividade de ALT neste estudo apresentaram uma discreta elevação entre os grupos estudados. Esta elevação foi maior à medida que as doses de acetona cianidrina foram também maiores, entretanto não o suficiente para demonstrar diferença significativa entre os grupos testados e grupo controle. Nossos resultados da ALT são compatíveis com os obtidos por Sousa (2004), que estudou efeitos tóxicos do cianeto em ratas em período pré-natal. Porém, os valores de ALT registrados aqui, são maiores que os valores de referência (51 U L^{-1}) sugerido por Dantas (2006) como parâmetro normal para ratos wistar saudáveis de laboratório. A diferença entre os resultados obtidos neste estudo e os valores de referência sugeridos por Dantas (2006), pode ser atribuída à diferença entre as técnicas usadas na dosagem da atividade enzimática utilizadas em cada estudo, pois Duncan & Prasse (1982) salientam que diferentes métodos utilizados para a realização de testes enzimáticos variam, fornecendo valores muitas vezes discrepantes. Por isso a comparação com outros estudos, mesmo quando a unidade utilizada for a mesma, só será válida se os mesmos substratos, pH e temperatura de reação forem usados. Também, Haldelman & Blue (1993) observaram que a metodologia aplicada sempre interfere com os resultados laboratoriais. Lillie (1996) relataram ainda, que os resultados só podem ser generalizados em determinadas condições específicas de estudo, com a mesma linhagem de ratos, idade e dieta, assim como a metodologia, que poderiam interferir nos resultados (Dantas *et al.* 2006).

No G5, que recebeu $125 \mu\text{mol}$ de acetona cianidrina por via oral, os valores séricos médios de ALT encontrados não se elevaram como os demais grupos. Isto ocorreu por que neste grupo, quatro animais morreram imediatamente após a administração de acetona cianidrina. Com a coleta pós-morte imediata do sangue para dosagem enzimática, não houve o intervalo de tempo necessário para que a elevação da atividade enzimática ocorresse. De fato, salientado por Vasconcelos (2007) em humanos, é esperado um aumento da atividade ALT após seis horas decorridas da injúria que leva a lesão tecidual.

A elevação significativa da FA nos grupos que receberam 25 , 50 e $75 \mu\text{mol}$ de acetona cianidrina sugere lesão hepática. Este grupo de enzimas é um

indicador amplamente utilizado na avaliação hepato-biliar, e seus níveis elevados freqüentemente estão relacionados à lise dos hepatócitos (Renner & Dallenbach, 1992). É necessário destacar que os animais que receberam 100 e 125 μmol morreram após a administração de acetona cianidrina, nestes casos é razoável supor que não houve tempo suficiente para que a elevação da FA sérica ocorresse. São escassos na literatura trabalhos que avaliem alteração da FA após administração de acetona cianidrina. Valores alterados para a FA foram encontrados em ratos expostos cronicamente a diferentes doses de flúor, que apresentaram lesões hepáticas (Fernandes *et al.* 2011).

Os sintomas respiratórios, locomotores e neurológicos observados no presente estudo, bem como as lesões teciduais hepáticas, pulmonares e do SNC, provavelmente estão associados a fatores bioquímicos celulares decorrentes da presença de elevadas concentrações de cianeto: (i) incapacidade da hemoglobina de carrear O_2 devido à afinidade do cianeto com o íon férrico da porção heme, levando a uma hipóxia tissular; (ii) choque por acidose metabólica causada por elevadas concentrações de lactato resultante da incapacidade celular em utilizar energia através do ácido tricarboxílico devido a inativação da enzima citocromo-oxidase a3 (Alves *et al.* 2013); (iii) descompensação nas concentrações de Ca^{++} intra e extra-celular resultando na peroxidação lipídica.

No encéfalo, as ações tóxicas do cianeto aparecem mais pronunciadas. Este fato ocorre provavelmente pela baixa capacidade deste tecido em obter energia pela via anaeróbica, alta demanda energética e pequena quantidade de reserva de energia existente (Johnson *et al.* 1987; Brierly *et al.* 1976; Yamamoto, 1989). Além disso, já se conhece a capacidade de altas doses de cianeto em: a) esgotar a dopamina e o ácido gama-aminobutírico (GABA), b) elevar o glutamato em várias regiões do cérebro, c) causar hiperamoniemia e d) aumentar concentrações de aminoácidos aromáticos neutros, causando encefalopatia e levando a perda da consciência (Yamamoto, 1990). Persson (1985) encontrou também níveis baixos de GABA causado pelo cianeto em cérebro de ratos.

Os exames histopatológicos dos animais dos grupos tratados com acetona cianidrina revelaram lesões importantes como degeneração e necrose hepática, e

degeneração, congestão, edema no encéfalo, proteína intratubular renal e edema pulmonar. As alterações teciduais leves nos animais do GC provavelmente estariam associadas à forma de manejo (ambiente e alimentação), bem como a forma de eutanásia pelo CO₂.

As reações inflamatórias observadas no parênquima pulmonar e hepático dos animais dos grupos três, quatro e cinco podem ser associadas ao dano tecidual. A inflamação, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares e celulares, tem como finalidade remover o estímulo lesivo e iniciar a recuperação tecidual local. No caso da degeneração e necrose por agente químico, o resultado do catabolismo celular atuam como estímulos irritantes atraindo células inflamatórias. Ainda, a resposta inflamatória a um estímulo agudo, como na intoxicação registrada no presente estudo, evolui a partir de uma fase vascular que tem início imediatamente após o dano e envolve basicamente a microcirculação. Realmente, após uma agressão ocorre vasodilatação local e recrutamento da maioria dos capilares da rede, seguida de aumento da permeabilidade capilar. O aumento imediato da perfusão tecidual e da permeabilidade é mediado por aminas vasoativas, histamina e serotonina, que são liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a agressão. Inicialmente, saem do leito capilar eletrólitos e pequenas moléculas, constituindo o transudato posteriormente saem também moléculas maiores como albumina e fibrinogênio, constituindo um exudato. A saída de proteínas para o espaço extravascular é acompanhada de saída de água, levando à marginalização dos leucócitos, que passam a circular junto ao endotélio. Esses fenômenos vasculares e celulares explicariam a hemorragia, a congestão e o edema observados, principalmente no parênquima pulmonar e hepático dos animais dos grupos três, quatro e cinco (Robbins & Cotran, 2010).

Os efeitos tissulares observados nesse estudo podem estar associados à perda da homeostasia do cálcio nos meios intracelular (que deve ser 0,1 µmol) e extracelular (1,3 µmol). De fato, as alterações citomorfológicas da lesão celular irreversível incluem: lesão da membrana plasmática, influxo de cálcio na célula, tumefação e vacuolização mitocondrial, densidades amorfas nas mitocôndrias e tumefação lisossomal (McGavin e Zachary, 2009). O aumento do cálcio

intracelular leva a formação de radicais livres resultando em peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial, e lesões celulares muitas vezes irreversíveis. Esse fenômeno poderia ser a causa da desmielinização observada no cerebelo nos animais do G5.

O acúmulo de cálcio intracelular, a produção de radicais livres, e consequente formação de espécies reativas de oxigênio causa um processo de estresse oxidativo, que está relacionado com lesões celulares que incluem (a) peroxidação lipídica de membranas, pois na presença de O_2 , os radicais livres causam peroxidação dos lipídios dentro das membranas citoplasmáticas e das organelas, podendo levar a lesões extensas nestas membranas; (b) modificação oxidativa das proteínas que leva à modificação na conformação estrutural das proteínas com consequente lesão dos seus sítios ativos e perda de suas funções no caso de enzimas; (c) lesão do DNA, pois os radicais livres são capazes de quebrar os filamentos únicos e duplos do DNA, isto implica no envelhecimento celular e na transformação maligna de células (Robbins & Cotran 2010).

O provável causador da lesão nas membranas mitocondriais é o cianeto, já que é descrito que elevadas concentrações de cianeto intracelular promove aumento da permeabilidade da membrana ao cálcio. O cálcio, que normalmente está acumulado na mitocôndria e no retículo endoplasmático, é então liberado e se acumula no interior da célula. Concomitantemente, o aumento de cálcio intracelular também está associado a uma disfunção dos canais de cálcio da membrana celular, já que o transporte do cálcio para fora da célula se dá por transporte ativo e consequente consumo de ATP e a produção de energia se encontra comprometida. Assim, o acúmulo de cálcio ativa enzimas com efeitos prejudiciais às células, estas enzimas incluem as fosfolipases (que lesam as membranas), as proteases (que clivam as proteínas de membrana e citoesqueleto), endonucleases (responsáveis pela fragmentação da cromatina e do DNA) e as ATPases (que contribuem para a depleção de ATP) (Robbins & Cotran 2010).

7 Conclusões

No modelo murino, a acetona cianidrina possui efeitos agudos hepatotóxicos, pulmonares e no sistema nervoso central, e em concentrações de até 25 $\mu\text{mol/kg}$ de peso vivo os animais sobrevivem a fase aguda.

8 Referências Bibliográficas

Aletor, V. A. (1993). Cyanide in garri. Assessment of some aspects of the nutrition, biochemistry and hematology of the rats fed garri contain varying residual cyanide levels. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v 44, n. 4, p. 289-295.

Alves, D. A.; Seabra, C.; Silva, J. (2013). Cianeto. Toxicologia Mecanística. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. <<http://remiao.wix.com/toxicologia>>.

Amorim, S. L.; Medeiros, R. M.T.; Franklin Riet-Correa, F. (2005). Intoxicação experimental por *Manihot glaziovii* (Euphorbiaceae) em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v 25, n.3, p.179-187.

Beasley, D. M. G.; Glass, W. I. (1998). "Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations"; *Occupational Medicine*. v 48 n.7 p. 427-431.

Brasil 2011. Produção da Pecuária Municipal (PPM). Vol.35. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Brasília, DF.

Brierley, J. B.; Brown A. W.; & Calverley, J. (1976). Cyanide intoxication in the rat: physiological and neuropathological aspects. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v 39, p.129-140.

Brito, V. H. S.; Ramalho, R. T.; Rabacow, A. P. M.; Moreno, S. E.; Cereda, M. P (2009). Colorimetric Method For Free and Potential Cyanide Analysis of Cassava

Tissue. Agricultural College, Catholic University (UCDB), Campo Grande, MS, Brazil.

Cezar, A. S.; Catto, J. B.; Bianchin, I. (2008). Controle Alternativo de Nematódeos Gastrintestinais dos Ruminantes: Atualidade e Perspectivas, *Ciência Rural*, Santa Maria, v 38, n 7, p.2083-2091, ISSN 0103-8478

Coles, G. C.; Jackson, F.; Pomroy, W. E.; Prichard, R. K.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Silvestre, A.; Taylor, M. A. and Vercruysse, J.(2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. v 136, p.167–185.

Corwin, R. M., (1997). Economics of gastrointestinal parasitism of cattle. *Veterinary Parasitology*. v 72, p. 451–460.

Couto, I. S., (2010). Cianeto.Toxicologia Mecanística. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
<http://www.ff.up.pt/monografias_toxicologia/monografias/ano0910/cianetos/site.html>

Cox, R. F. B.; Stormont, R. T. (1935) “Acetone Cyanohydrin”, *Organic Syntheses, Coll.* v 15, p. 1.

Dantas, J. A.; Ambiel, C. R.; Cuman, R. K. N.; Baroni, S. & Bersani-Amado, C. A., (2006). Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Science Health Science. Maringá*, v 28, n 2, p. 165-170.

Demeler, J.; Kuttler, U.; El-Abdellati, A.; Stafford, K.; Rydzik, A.; Varady, M.; Kenyon, F.; Coles, G.; Hoglund, J.; Jackson, F.; Vercruysse, J. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2010). Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* v 174, p. 58–64. doi: S0304-4017(10)00461-9.

Duncan, J. R.; Prasse, K. W. (1982). *Patologia Clínica Veterinária*. Apêndice I. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

Fernandes, M. S.; Iano, F. G.; Rocia, V.; Yanai, M. M.; Leite, A. L. L.; Furlani, T. A.; Buzalaf, M. A. R.; Oliveira, R. C. (2011). Alkaline Phosphatase Activity in Plasma and Liver of Rats. *Brazilian Archives: Biology Technology*. v 54 n.6: p. 1187-1192.

Granum, M.; Wanapat, P.; Wachirapakorn C, and Toburan, W. (2007). A Comparative Study on the Effect of Cassava Hay Supplementation in Swamp Buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Cattle (*Bos indicus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. v 20, p. 1389-1932.

GraphPad Software, disponível em: <<http://www.graphpad.com/>>; acessado em 01/06/2014.

Gupta, R.; (2009). Handbook of toxicology of chemical warfare agents. Academic Press.

Guyton, A. C. & Hall, J. E., Tratado de Fisiologia Médica. 9ª, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Haldelman, C.T.; Blue, J., (1993). Laboratory data: read beyond the numbers. In: Veterinary laboratory medicine: in practice. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1993.

Hammel, J.; (2011) "A Review of Acute Cyanide Poisoning With a Treatment Update"; Critical Care Nurse, 31.

Hammerberg D. V. M. (1986). Pathophysiology of Nematodiasis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practic*. v 2 n. 2, p. 225-234.

Hariharakrishnan, J.; Satpute, R. M.; Bhattacharya, R. (2010). Cyanide-induced changes in the levels of neurotransmitters in discrete brain regions of rats and their response to oral treatment with α -ketoglutarate. *Indian Journal of Experimental Biology*. v 48, p. 731-736.

Informe Técnico Gold Analisa. Disponível em: <http://www.goldanalisa.com.br/publicacoes.asp> .

Jardim W. R. 1974. Os Ovinos. Nobel, São Paulo. 196p.

Johnson, J. D.; Conry, N. G. and Ison, G. E. (1987). Alteration of Cytosolic Calcium Levels in PC12 Cells by Potassium Cyanide. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v 88, p.217-24.

Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. v 20, p. 477–481.

Keresztessy, Z.; Brown, K.; Dunn, Alison and Hughs M. A. (2001). Identification of essential-site residues in the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, v.353, p.199-205.

Kouman, P. (1989). Manual de Exames de Laboratório 500 exames. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro – São Paulo.

Kousparou, C. A.; Epenetos, A. A.; Deonarain, M. P. (2002). Antibody-guided enzyme of cancer producing cyanide results in necrosis of targeted cells. *International Journal of Cancer*, v. 99, p. 138-148.

Lillie, L. E.; Temple, N. J.; Florence, L. Z. (1996). Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Human & Experimental Toxicology*, v. 15, n. 8, p.612-616.

Lindqvist, A.; Ljungström, B. L.; Nilsson, O.; Waller, P. J. (2001). The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v 42 p.377-389.

Llorens, J. (2004). Enfermedades neurológicas asociadas al consumo de variedades de mandioca con alto contenido en gluconitrilos. *Endocrinology Nutrition*. v 51n.7 p. 418-25.

Lopes, A. N., (2001). Avaliação da Dose Letal (DL₅₀) Oral e Efeitos Metabólicos da Linamarina Extraída de Mandioca, em Ratos. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu.

López, I.; Cantó, V. &Tejada, S. (2004). In vitro effect of condensed tannins from tropical fodder crops against eggs and larvae of the nematode *Haemonchus contortus*. *Food, Agriculture and Environment*. v 3, p.191–4.

Manzano, H. (2006). Toxicidade do Cianeto em Suínos. Avaliação dos Efeitos Peri-Natal. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo.

McGavin, M. D.; Zachary, J. F. (2009). Bases da Patologia em Veterinária. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1475p.

Mendes, M. Q., Lopes H. J. J. (1973). Atualização em Bioquímica Clínica: Técnicas - Fundamento - Interpretação de Resultados. Belo Horizonte: MAI Editora, p. 123-125

Miller, O. (2001). Diagnóstico e terapêutica em Medicina Interna. Enciclopédia médica da Família. Editora: Livraria Civilizações Editora.

Mills, E. M.; Gunasekar, P.G.; Li, L.; Borowitz, J. L.; Isom, G.E. (1999). Differential Susceptibility of Brain Areas to Cyanide Involves Different Modes of Cell Death. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v 156, p. 6–16.

Netpana, N. M.; Wanapat, O.; Pongchompu and Toburan, W. (2001). Effect of condensed tannins in cassava hay on fecal parasitic egg counts in swamp buffaloes and cattle. In: Proc. International Workshop on Current Research and Development in Use of Cassava as Animal Feed, Khon Kaen University, Thailand. p. 41-43

Ohara, A. R. de; Cereda, M. P. (2006). Cassava crop in Assentamento 72 from Ladário city-MS, Brazil. In: International Meeting On Cassava Plant Breeding, Biotechnology, and Ecology, 1. Brasília. Universidade Federal de Brasília, p.50, Brasília-DF.

Oliveira Lima, A.; Soares, J. B.; Greco, J. B.; Galizzi, J.; Cançado, J. R. (1985). Métodos de laboratório aplicados à clínica – Técnica e Interpretação. 6ª Ed; Editora Guanabara. Rio de Janeiro.

Otsubo, A. A.; Pezarico, C. R. (2002). A cultura da mandioca em Mato Grosso do Sul. In: Otsubo, A. A.; Mercadante, F. M.; Martins, C. S. (eds.). Aspectos do cultivo da mandioca em Mato Grosso do Sul. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campo Grande: UNIDERP, p. 31-48.

Oxtoby, E.; Dunn, M. A.; Pancoro, A. and Hughes, M. A. (1991). Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Molecular Biology*. v.17, p. 209-219.

Persson, S. A.; Cassel, G. & Sellström, A. (1985). Acute Cyanide Intoxication and Central Transmitter Systems, *Fundam Applie Toxicology*. v 5, p. 150s.

Ramalho, R. T.; Aydos, R. D.; Cereda, M. P. (2010). Evaluation of acetone cyanohydrin effect in “*in vitro*” inactivation of the Ehrlich ascites tumor cells. *Acta Cirurgica Brasileira* – v 25 n.1 p. 111-116.

Ramalho, R. T. (2014) Efeito do tratamento com acetona cianidrina na evolução do tumor sólido e ascítico de ehrlich. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Renner, E. L. and Dallenbach, A. (1992) Erhöhte Leberenzyme: Was collagen-sandwich configuration. *American Journal of Physiology*. v 49, p. 281–286.

Ribeiro A. F. (2012). Alterações histopatológicas causadas pelo efeito da acetona cianidrina em fígado, rins, coração e pulmão de camundongos. Campo Grande. Dissertação – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Robbins & Cotran (2010). Patologia, Bases Patológicas das Doenças. 8ª edição, Elsevier Editora, São Paulo.

Seng, S. & Preston, T. R. (2003). Effect of grass or cassava foliage on growth and nematode parasite infestation in goats fed low or high protein diets in confinement. *Livestock Research for Rural Development*, v. 13, n. 8.

Shaw, D. L.; Vercruysse, J.; Claerebout, E.; Agneessens, J.; Dorney, P. (1997). Gastrointestinal nematode infections of first-season grazing calves in Belgium:

general patterns and the effect of chemoprophylaxis. *Veterinary Parasitology*. v 69, p. 103–116.

Silva, A. D. A. & Dias, F. M. (2004). Utilização da mandioca na alimentação animal. Instituto Agronômico de Pernambuco. Recife, 2p.

Silva, M. A.; Costa, B. M.; Tavares J. T. Q.; Oliveira, G. J. C.; Jaeger, S. M. P. L.; Strada, E. S. O. (2011). Variação nos teores de compostos cianogênicos durante o processo de fenação de ramas de mandioca (*Manihot sculenta* Crantz). *Magistra, Cruz das Almas*, v. 23, n. 3, p. 149-153, jul./set.

Soler-Martín, C.; Riera, J.; Seoane, A.; Cutillas, B.; Ambrosio, S.; Boadas-Vaello, P.; Llorens, J. (2010). The targets of acetone cyanohydrin neurotoxicity in the rat are not the ones expected in an animal model of konzo. *Neurotoxicology and Teratology*, p. 289–294.

Sousa, A. B. (2004). Avaliação dos Efeitos Tóxicos do Cianeto e do Tiocianato no Período Perinatal. Estudo em Ratos. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Sousa, R. G.; Falcão, H. S.; Barbosa Filho, J. M.; Melo Diniz, M. F. F.; Batista, L.M. (2013). Atividade Anti-Helmíntica de Plantas Nativas do Continente Americano: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. Campinas, v15, n.2, p.287-292.

Teixeira, J. R. F.; Silva, M. A. da. (2007). Tipologia de sistemas de produção bovina com ênfase na ocorrência de ectoparasitoses. *Revista Brasileira de Zootecnia*. Viçosa, v 36, n. 6, p. 2176-2183.

Thamsborg, S. M.; Roepstorff, A.; Larsen, L. (1999). Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Veterinary Parasitology*. v 84, p. 169–186.

Urquhart, G. M.; Armour, J.; Duncan, J. L.; Dunn, A. and Jennings, F. (1996). *Veterinary Parasitology*, 2nd edn. Blackwell, Oxford.

Vasconcelos, L. A. B. R.; Almeida, E. A.; Bachur, L. F., (2007). Avaliação Clínica e Laboratorial Hepática em indivíduos com insuficiência cardíaca congestiva. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. v 88, n. 5, p. 590-595.

Vercruysse, J.; Dorny, P. (1999). Integrated control of nematode infections in cattle: a reality? A need? A future?. *International Journal of Parasitology*. v 29, p.165–175.

Way, J. L. (1984). Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. v 24, p. 451–481.

Yamamoto, H. A. (1989). Hyperammonemia, Increased Brain Neural and Aromatic Amino Acid Levels and Encephalopathy Induced by Cyanide Mice. *Toxicology Applied Pharmacology*, v 99, p. 415.